

均値は 2-DCB で 336~759 ng/g、2-TCB で 172~426 ng/g であった。この値と保存中経時変化測定値よりそれぞれ度数分布表を作成した。この結果、参加機関測定値は経時変化測定値よりもやや低い例があることが判明した。

8 機関が測定した照射レトルト牛丼（青）中の 2-アルキルシクロブタノンの濃度を追跡調査期間（10 ヶ月間）の濃度分布と比較した。その結果、2-DCB および 2-TCB の濃度がともに追跡期間内の分布内であったのが 3 機関、2-DCB および 2-TCB とともに追跡期間内の分布値を下回ったのが 2 機関、2-DCB および 2-TCB いずれかが、追跡期間内の分布値外であったのが 3 機関であった。

市販されている常温での長期保存が可能な食品は、通常は缶詰やレトルト食品のように密封しており、開封後は常温保存できない。今回は、試料調製後に密封する技術が無かったことと、定性分析が主であることから、照射後の均一化操作を行わなかった。そのため、分析値のばらつきは大きい、長期保存における 2-アルキルシクロブタノンの安定性が確認でき、また全機関が当該試験において照射試料を正しく判定できることが判明した。

1-4. 外部精度管理試験

配布したスモークサーモン、チーズ（照射）、ピーナッツバター（照射）を分析した結果、全機関が照射された試料のみから 2-アルキルシクロブタノンを検出した。参加機関の外部精度管理試験結果より度数分布表を作成し、また Xbar-R 管理図を作成した。これを評価方法の基準で判定した。チーズ（1.6 kGy 照射）試料の評価結果は、2-DCB の目標値 172 ng/g に対し、8 機関の平均値

は 181 ng/g であった。Xbar 管理図は 4 機関が適正域を外れた。R 管理図は全機関が適正域内であった。2-TCB の目標値 73.6 ng/g に対し、8 機関の平均値は 84.8 ng/g であった。Xbar 管理図は 3 機関が適正域を外れた。R 管理図は全機関が適正域内であった。また、ピーナッツバター（1.2 kGy 照射）では、2-DCB の目標値 89.0 ng/g に対し、8 機関の平均値は 86.3 ng/g であった。Xbar 管理図は 2 機関が適正域を外れた。R 管理図は 1 機関が適正域を外れた。2-TCB の目標値 42.4 ng/g に対し、8 機関の平均値は 42.9 ng/g であった。Xbar 管理図は 2 機関が適正域を外れた。R 管理図は 1 機関が適正域を外れた。

参加機関の GC-MS 測定条件と精製条件によると、各機関は大きな変更をせずに提示した分析法を使用し、測定条件も入手したシリカゲルの違いや所有する機器の差異にとどまった。

Xbar 管理図では中央値を目標値としたが、8 機関の平均値はその 101~115% の範囲内であった。8 機関中 5 機関が 1 項目以上で管理限界を超えた。内訳は 4 機関が平均値で 1~4 項目、1 機関は平均値で 2 項目と範囲で 2 項目であった。

魚や植物に含まれる脂肪は、不飽和度が高めであり脱脂操作時に沈殿が生成しにくい性質がある。また、チーズは牛乳脂肪由来ではあるが発酵食品のため、動物性脂肪とやや異なる挙動を見せた。そのため、今回用いた試料の脱脂では、低温での遠心分離でも下層が固化せず、液状のまま二層に分離することがあり、上層の採取時に下層が混ざる可能性が高い。逆にこれを避けようとする上層を取り残す可能性がある。

これらが今回の試験での数値のばらつきの要因のひとつとなった可能性がある。H 機関では脱脂時に下層の混入を極力避けたため、分析値が低くなった可能性が挙げられた。そこで、残った試料を用いて再度試験を実施し、脱脂時に上層を十分に採取した結果、チーズで 2-DCB が 191 ng/g、2-TCB が 100 ng/g、ピーナッツバターで 2-DCB が 101 ng/g、2-TCB が 49 ng/g となり、均一性確認時に近い値が得られた。

F 機関では、全ての定量値が過大となり、チーズとピーナッツバターの両方で Xbar 管理図の上部限界を超え、レトルト牛井の報告値も最大であった。検量線作成時に問題があったと考え、聞き取り調査をした結果、検量線作成時に標準溶液を窒素吹き付けで乾固し、試料と同様に内部標準液で溶解する操作を行ったことが判明した。この際に 2-アルキルシクロブタノンの損失があったことが考えられたが、実験的に再現することができず、原因究明はできなかった。

照射履歴の判定については、全機関が誤回答なく照射された試料を陽性、非照射の試料を陰性と判定した。判定項目の主要イオン比については「50%を目安とする」となっており、機械的に 50%で判定せず、50%に近い値をもって陽性と判定された。脱脂操作の容易でない試料でも 2-アルキルシクロブタノンの測定と照射履歴の判定可能であったことから、当該分析法は汎用性が高いことが示唆された。

本研究の精度管理試験などで照射した線量は、諸外国での照射実態を考慮して 2.7kGy 以下であった。昨年度国立医薬品食品衛生研究所において、生レバーの放射線殺菌研究が実施されたが、その結果では、

殺菌に必要な線量は 2~4kGy であった。従って本研究成果は、もし殺菌目的での食品照射が許可された場合、十分に活用できる情報と考えられる。

1-5. 照射履歴判定

参加機関の照射履歴判定結果から、全機関で陰性試料から 2-アルキルシクロブタノンは検出されなかった。照射試料の測定において、各判定項目では、全ての機関で全てのピークの S/N 比は 3 以上であり、主要イオンの判定では一部で 40%台が見られたが、50%は「目安」とされる目標値であり、それに準ずるものとして陽性と判定された。2つのモニターイオンのピーク面積比は、7機関においては標準品と比較して±20%の範囲内であったが、1機関ではレトルト牛井測定時に妨害成分の影響で DCB の m/z 112 の面積値が大きくなり、標準品の面積比より約 50%増加した。しかし、TCB では面積比に問題はなく、照射履歴の判定は正確に行えた。

2 斉藤分担研究

DON 標準品による検量線(シグモイド曲線)から IC_{50} 値を算出し、検査機関間で比較することで、ELISA キットの性能と実験者の技術レベルを評価した。キット付属の標準液に新たに加えた低濃度標準液(1.23 ng/mL)はシグモイド曲線の直線領域(3.7~33.3 ng/mL)からは外れるものの、4パラメータ・ロジスティック・モデルで解析した回帰曲線上にはほぼ該当していたことから、この濃度付近においても定量計算は可能であると思われた。

参加した 7 検査機関間の IC_{50} 値の比較データから平均値は 16.4 ng/mL であり、7 検

査機関中 5 機関が標準偏差 (SD: 3.5 ng/mL) 以内 ($|z\text{-Score}| < 1$) に、また残りの 2 機関の値も標準偏差の 2 倍以内 ($|z\text{-Score}| < 2$) に収まっていたことから、用いた ELISA キットの性能に問題は無く、また、各検査機関において本実験に従事した実験者の技術レベルにも問題がないことが確認された。

高濃度添加試料 (100 ppb) の室間再現精度については、指定の前処理を行った場合、いずれの検査機関のデータも添加濃度より若干低めではあったが、添加濃度と平均値 (最確値) との乖離は 20% 未満であり、また残渣の $z\text{-Score}$ は全て $|z| < 2$ の範囲に収まっていたことから、室間再現精度実験として信頼性の高い満足できる結果が得られた。なお、測定値が添加濃度より低目となったのは、前処理としてアセトニトリル抽出および多機能カラム MycoSep[®]#227 による精製工程が加わったため、操作過程での損失があったものと推察された。

他方、前処理を行わなかった場合、添加濃度と最確値との乖離は 10% 程度と良好な結果が得られ、7 検査機関中 5 機関の測定残渣 ($z\text{-Score}$) は、 $|z| < 1$ であった。残りの 2 機関も若干高めではあったが、 $|z| < 2$ の範囲に収まっており、スクリーニング法としてほぼ満足できる結果が得られた。したがって、ビール中に DON が高濃度 (100 ppb) で汚染されている場合には、試料精製を行うことなく水で希釈する処理のみで信頼性の高い ELISA 測定を行えることが示唆された。

低濃度添加試料 (10 ppb) の室間再現精度については、前処理を行った場合、上記の高濃度添加の結果と同様に、7 機関中 5 機関は測定残渣が $|z| < 1$ 、残りの 2 機関も $|z|$

< 2 の範囲に収まっていた。しかし、添加濃度と最確値との乖離は 80% 程度と比較的大きく、7 検査機関中でのばらつきも最大値/最小値で約 3 倍の開きが認められた。

他方、“前処理なし”の測定結果はいずれの検査機関も $|z| < 2$ の範囲に収まっていたが、添加濃度と最確値との乖離は約 200% と大きくなった。これら低濃度添加試料において測定精度が低下した理由として、添加レベルは用いた ELISA キットの検量線範囲内ではあったが、マトリクス由来の“擬陽性”となる夾雑物の影響を受けたことが推察された。これは“前処理あり”の方が“前処理なし”に比べて添加濃度と最確値との乖離が比較的小さいこと、また、最確値そのものも、“前処理なし”と“前処理あり”との比が 2 倍に近い値が示されたことから裏付けられると推察された。

なお、外部精度管理用試料の作製に用いたもとのビールに、ブランクとして DON が混入していたことも考えられたが、高濃度および低濃度添加試料をそれぞれ別途に GC/MS および LC/MS/MS を用いて DON 濃度を測定したところ、いずれも添加濃度 $\pm 10\%$ 程度の値が得られたことから、ブランク中の DON 濃度による影響はほとんどなかったものと判断した。

以上の結果から、低濃度試料では精度が低下したものの、前処理操作を行なうことで、DON 濃度が 10 ppb 以上のビール試料であれば、ELISA でのスクリーニングが可能であることが示唆された。

3 村山分担研究

3-1. GC/MS によるクロロピリホス、フルトラニル、マラチオンの定量

GC/MS による定量の例として GC/MS による農薬等の一斉試験法（農産物）によるほうれんそう中のクロルピリホス、フルトラニル、マラチオンを絶対検量線法およびマトリックス検量線法により定量した。測定対象農薬を含まないことを確認したほうれんそうに対して、各農薬それぞれを 0.02 ppm 相当添加し、回収率を検討した。マトリックス検量線法のマトリックス標準溶液は、試験溶液と同時に調製したマトリックス試験溶液と標準溶液を 1 : 1 で混合調整した。同じ検査員が異なる日時に 2 回の試行を実施した。

その結果、絶対検量線法による回収率は 119~200% でありマトリックス効果によるレスポンスの増強を受けている事が分かった。各農薬それぞれを 0.02 ppm 相当添加回収した試験溶液のクロマトグラム上では妨害ピークは認められないので、いわゆるマトリックス効果による影響であると考えられる。一方、マトリックス検量線法による回収率は 78~106% であり、レスポンスの増強は相殺されているが、試行 2 において回収率がいずれも 80% 以下になっている。マトリックス検量線法は検量線作成用標準溶液と、試験溶液のマトリックスの種類、濃度を等しくする事により、マトリックス効果の度合いを等しくして、定量精度を高める方法であるが、試験法の頑健性の程度により、同一試料から同時並行で抽出精製してもマトリックスに差が出る可能性を示している。

別の検査員がにんじんで同じ試験を実施して、絶対検量線法、マトリックス検量線法、標準溶液添加法を比較した結果、絶対検量線法による結果は回収率 164~201% であり、ほうれんそうの結果と差はなかったが、マトリックス検量線法による結果は回収率 123~138% であり、ほうれんそうの結果よりプラス側にバイアスがかかっている。一方、標準溶液添加法による結果は回収率 95~107% であり、最も 100% に近い回収率が得られた。

さらに別の検査員が添加量を 10 倍の 0.2 ppm としてにんじんで同じ試験を実施した。当該試験においても、標準溶液添加法による補正結果は良好であった。

また、質量分析計以外の検出器を用いた例として炎光光度検出器付きガスクロマトグラフィー (GC-FPD) によるクロルピリホスの添加回収試験と、GC/MS と同様に 0.02 ppm 相当添加回収試験を異なる検査員が異なる日時に実施した。その結果、回収率は 94~105% の範囲内、RSD は 3.28% であり、回収率、再現性ともに良好な結果であった。

クロルピリホスを 0.02 ppm 相当添加回収した試験溶液のクロマトグラムは GC/MS と比較して、夾雑ピークおよびベースラインの変動が目立つが、いずれもクロルピリホスの定量を妨害しなかった。

3-2. LC/MS によるサイクラミン酸の定量

サイクラミン酸は塩素処理誘導体化して HPLC-UV にて定量する方法が第 2 版食品中の食品添加物分析法 2000 に記載されているが、乾燥粉末食品等の一部では添加回収率が 0~30% 程度に低下する場合がある。このような場合には HPLC-UV に代わり LC/MS により定量することがあるが、マトリックス効果が現れやすい。

今回検討した結果は、絶対検量線法によって 82~124% の回収率が得られたが、標準溶液添加法により回収率、再現性ともに

向上した。20 ppm 標準添加試験溶液に 20 ppm 相当の標準溶液を 1 : 1 で混合した溶液のクロマトグラムで、妨害ピークは認められなかった。

サイクラミン酸を 20 ppm 相当含む試験溶液に対して、0、20、40 ppm 相当の標準溶液を 1 : 1 で混合した時、それぞれのレスポンスは $(20+0) / 2=10$ 、 $(20+20) / 2=20$ 、 $(20+40) / 2=30$ ppm 相当であることが期待されるので、回帰分析結果から $y=0$ に外挿することにより試験溶液中の濃度を求められる。

マトリックス検量線法では先に述べたとおり、試験溶液と検量線作成用標準溶液のマトリックスはそれぞれ別に作成するため、試験法の頑健性の程度により、同一試料から同時並行で抽出精製してもマトリックスに差が出る可能性があるが、標準溶液添加法では試験溶液が均一である限りマトリックスに差が出る事はない。また、マトリックス検量線用のマトリックスを別途調製する必要がない。標準溶液添加法では、試料数の増加に伴いクロマトグラフィーの測定回数が増加するが、人手を省ける上に、より正確な結果が得られる点で、標準溶液添加法はマトリックス検量線法より優れている。

3-3. MG および LMG への食品添加物の影響調査

MG の $20 \mu\text{g/mL}$ アセトニトリル溶液は濃い青緑色であるが、 $0.2\% \text{SO}_2$ 水溶液を加えると直ちに退色し、6 時間後には MG は初期の 30% にまで減少し、保持時間 11.8 分に大きなピークが生じた。このピークの質量スペクトルには $[\text{M}-\text{H}_2\text{SO}_3-\text{H}^+]=411+$ が認められることから、 $\text{MG}-\text{SO}_2$ 付加体の生成が考え

られた。

MG に $0.2\% \text{H}_2\text{O}_2$ 水溶液を加えた系においては 6 時間後もピーク強度、質量スペクトルに変化は認められなかった。

LMG に $0.2\% \text{SO}_2$ 水溶液を加え、6 時間後には LMG は初期より 5% 程度減少し、保持時間 11.8 分にピークが生じた。このピークの質量スペクトルには MG の擬分子イオン $[\text{M}-\text{H}^+]=329+$ の他に $[\text{M}-\text{SO}_3-\text{H}^+]=409+$ が認められた。

LMG に $0.2\% \text{H}_2\text{O}_2$ 水溶液を加えた場合、6 時間後には LMG は初期より 3% 程度減少し、保持時間 10.2 分にピークが生じた。このピークの質量スペクトルには MG の擬分子イオン $[\text{M}-\text{H}^+]=329+$ の他に水付加体イオンであると考えられる $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{H}^+]=347+$ が確認された。

4 鎗田分担研究

4 種の基材を用いて評価した IDMS の精確さを評価した。分析対象農薬の回収率は、添加した農薬量に対して 76~93 % であったのに対し、IDMS による測定値は校正標準液 (マトリックス有) を用いた場合で 99.3~102.8 %、校正標準液 (マトリックス無) を用いた場合で 87.5~100.5 % であった。標識体を内標準に用いる IDMS では、試料の前処理過程における分析対象農薬の回収率 (損失) が補正されるために、真度の高い分析値が得られたものと考えられた。一方、併行精度についても、分析対象農薬の回収率測定ではおよそ 4 % 以下であったのに対し、IDMS 測定の併行精度はほとんど分析対象農薬について 1.5 % 以下であり、IDMS の方がより良好な再現性が得られた。以上から、IDMS

を適用することにより、外部精度管理調査試料中の分析対象農薬を精確に分析できることが示された。

なお、IDMS では GC/MS 測定におけるマトリックス効果も補正することができると考えられているが、校正標準液のマトリックスの有無によって異なる分析結果が得られた。得られたピークの一例として、にんじん基材中のイソキサチオンとその標識体のクロマトグラムから他の測定試料と比較して、校正標準液（マトリックス無）では標識体のピークが相対的に小さくなる傾向があった。その原因は明らかではないが、IDMS を適用した場合でも、マトリックスマッチングを施した校正標準液を用いた方が、より真度の高い分析結果が得られるものと考えられた。

正確さを確認した分析法 1 と、別途正確さを確認した分析法 2 によって、平成 25 年度外部精度管理調査（残留農薬検査 I）の調査試料を分析した。フェニトロチオンの分析値は分析法 1 が 0.476～0.499 $\mu\text{g/g}$ 、分析法 2 が 0.488～0.506 $\mu\text{g/g}$ 、クロルピリホスの分析値は分析法 1 が 0.244～0.252 $\mu\text{g/g}$ 、分析法 2 が 0.237～0.244 $\mu\text{g/g}$ であり（すべて $n=5$ ）、両法の結果はほぼ一致していた。そこで、分析法毎に(1)式の F_s 、 R_s 、 R_c 、 $M_{sp(s)}$ 、 M_s に係わる不確かさから算出した合成標準不確かさを重みとして、重み付け平均値とその不確かさを算出した。その結果はフェニトロチオン：(0.495 \pm 0.019) $\mu\text{g/g}$ 、クロルピリロス：(0.245 \pm 0.014) $\mu\text{g/g}$ （重み付け平均値 \pm 拡張不確かさ（包含係数：2））であった。

以上の結果を外部精度管理調査の結果と比較した。調査試料の調製における分析対

象農薬の添加濃度は、フェニトロチオンが 0.5 $\mu\text{g/g}$ 、クロルピリロスが 0.24 $\mu\text{g/g}$ であり、IDMS による分析結果はこれと良く一致した。一方、外部精度管理調査の参加機関の結果から決定した付与値（ 2σ 処理後の従来方式による）は、フェニトロチオンが (0.458 \pm 0.123) $\mu\text{g/g}$ 、クロルピリロスが (0.224 \pm 0.057) $\mu\text{g/g}$ （平均値 \pm 標準偏差の 2 倍）であった。IDMS による分析値はこれより約 8 % 高かった。この原因としては、参加機関のほとんどが、試料前処理における分析対象農薬の回収率（損失）を補正していないためと考えられた。また、参加機関間のばらつき（標準偏差）に対して、IDMS による分析結果の不確かさはフェニトロチオン：15 %、クロルピリロス：25 % であり、IDMS による分析値の不確かさは充分小さいことが示された。

5 渡辺分担研究

5.1 理化学検査のための適正調査試料の作製：

新基材として、果実ペースト（いちご及びバナナ）を用いた試料中の着色料の定性試験用調査試料の作製を試みた。

許可されている酸性タール色素 12 物質を、それぞれの基材に加えて混合し、均一性を確認した（ $n=5$ ）。

その結果、いずれの試料からも、抽出、精製において基材の妨害を受けることなく、添加色素が正しく検出された。果実ペーストは、やや粘性が高く、混合が不完全となることが懸念されたが、 $n=5$ の試料いずれからも、同様の色調及び色度のスポットが得られた。

魚肉製品として、鮭フレークを検討し

た。鮭フレークは脂質が 25~30%あり、アルミニウムレーキを用いた油性溶液による標準溶液添加の必要性が予測されたが、今回の水溶液での色素標準溶液の添加でも、色素が全体に浸透し、定性試験用試料として適用できると考えられた。

魚肉練り製品であるしんじょう及びかまぼこなどの高タンパク質食品からは、キサnten系色素がタンパクとの吸着により検出されにくい事例が挙げられるが、本研究では市販品への添加においては、抽出に特に問題はみられなかった。また、保存料（ソルビン酸及び PHBA エステル類）の新たな基材として、果実ペースト及び魚肉練り製品の適用性を検討した。果実ペーストについては、市販ペーストへのソルビン酸カリウム及び PHBA エステル類の添加について検討した。魚肉練り製品は、市販品へ添加混合し、ソルビン酸としての均一性の検討を行った。また、市販品への添加に加え、魚のすり身（生）にソルビン酸カリウムを添加し、加熱してかまぼこを作製し、新たな固体試料の基材開発に取り組んだ。果実ペースト（ソルビン酸及び PHBA エステル類）の均一性試験は、作製後、冷蔵及び冷凍保存した各 10 容器につき $n=2$ でソルビン酸及び PHBA エステル類の濃度を測定した。その結果、いちごペースト及びバナナペーストとも、冷蔵保存条件時の PHBA エチルでは均一性が得られなかったが、その他の添加した保存料については、いずれも F 値が有意水準 5%点である 3.020 未満となり、均一性が認められた。しかし回収率において、PHBA エチルで全試料とも 50%付近、また、冷蔵保存品における PHBA プロピルが約 60%、PHBA イソ

ブチルが 80%弱と、やや低かったため、冷凍保存品の前処理では、試料量を 15 g から 5 g へと変更して抽出した。その結果、PHBA プロピルは約 70%、PHBA イソブチルは約 90%と、ともに回収率が改善したが、PHBA エチルではほとんど変化がなかった。PHBA エチル及び PHBA プロピルの市場での使用実態がほとんど無い事、また、今回測定した回収率の観点から、これら 2 物質を除き、実試料化に向けては、ソルビン酸、PHBA イソプロピル、PHBA ブチル、PHBA イソブチルの 4 種の保存料を対象に、ペースト中の安定性を検討する予定である。また、冷凍試料の外観において、凍結部分と非凍結部分で斑になった。これは、試料の糖度が高いこと、また増粘剤の使用などが原因と考えられた。また、特に PHBA エステル類において、冷凍試料で F 値が 1 未満となる傾向が見られたことも、この凍結のばらつきにより、1 容器間で濃度差が大きくなったことが原因である可能性が考えられた。これらの事から、果実ペーストの保存条件は冷蔵とし、今後、長期保存安定性の確認が必要である。

既に調査試料として提供した大根漬けに続く固体試料として、まずは市販品のしんじょうにソルビン酸カリウムを添加し、均一性を確認した。その結果、冷蔵保存、冷凍保存のいずれにおいても均一性が得られたことから、実試料化の可能性があると考えられた。

固体試料として魚のすり身（生）を加熱してかまぼこ試料を作製し、検討を行った。まず、餅つき機の混練機能を利用して、魚のすり身（生）にソルビン酸カリウムを添加した。1 回の混練を、すり身 1 kg と

したところ、均一性が確認できたため、3 kg と 1 回の混練の量を増やしたが、いずれにおいても餅つき機の混練機能により、すり身中のソルビン酸が均一となることが確認できた。

次に、この均一となったすり身を用いて加熱工程の検討を行った。まず、餅つき機の「蒸し」機能を利用してかまぼこを作製し、ソルビン酸の均一性を確認した。均一となったすり身を 3 つに分け、それぞれサランラップに包み、餅つき機の臼部に立てて配置し、約 30 分蒸してかまぼことした。この蒸し上がったかまぼこ A、B、C をそれぞれ個体ごとに 6 分割し、一個体内での均一性を確認した。その結果、A、B、C それぞれの個体内でのソルビン酸の分布にばらつきはなかったが、A、B、C の 3 個体間（それぞれの分割部位 1~6 について、各 n=2 の平均値を 1 データとした）では、不均一であった。この時、A、B、C それぞれの上部だけの解析では、ばらつきは少なく、一方、蒸気接触が高いと考えられる下部についてはばらつきが大きく、均一性が得られなかった。このことから、蒸し位置によるすり身と蒸気接触の差異が不均一の原因と考えられたため、餅つき機の「蒸し」機能の利用は難しいと判断した。

そこで、ウィンディーオープンを用いて加熱し、かまぼこの作製を試みた。オープンを 110℃ に設定し、オープン付属の棚板に、チャック付袋 20 個に小分けしたすり身を直接設置したが、約 30 分加熱後に、一部の袋で内圧が上がり破裂する現象が見られ、また、すり身の一部に棚板との接触部分に焦げ付きが発生した。そのため、全試料をオープンから出し、チャック付袋

からすり身を取り出し、改めてサランラップに包み直した。また、焦げ付き防止のため、金属製金網カゴに載せ、再び 30 分程度加熱してかまぼこを作製した。なお、下段の試料 No. 6 については、n=2 測定のうち、1 測定値が明らかに他より数値が低く、棄却検定を行った結果、有意差を認めため、試料 No. 6 の測定結果を除外して分散分析を行った。その結果、下段についてのみ、均一性が得られたが、配置の前後の別や全試料での解析では均一性が得られず、全体的にばらついた結果となった。この原因としては、前述の通り、加熱中に包装や設置位置を変えたこと、また設置位置と加熱温度の違いなどが考えられる。したがって、今後は加熱容器の選定を含め、加熱条件及び試料数を増やし、再度、オープン内での温度分布等を検討することが必要である。

平成 24 年度において、玄米を農薬添加溶媒に浸漬後、浸漬溶媒を留去し、得られた玄米を乾燥・粉砕することで作製する方法を採用した。上記農薬添加玄米粉末試料を繰り返し 10 回の操作により作製し、10 バッチ間の均一性を検討した。一元配置の分散分析の結果、いずれの農薬においても得られた F 値は有意水準 5% 点より大きく、10 バッチ間の均一性は得られなかった。そこで今年度は、引き続きそれらの均質化の検討を行った。10 バッチの試料を合わせてロッキングミキサーを用いて混合し、混合毎に均一性試験を行った。混合は合計 3 回行ったところ、1 回の混合でマラチオンを除く 3 種の農薬は均一となったが 2 回の混合においてもマラチオンは均一にならなかった。3 回目の混合では、

均一性を示すF値は有意水準5%点より小さくなったが、マラチオンを除く3農薬のF値は1を著しく下回り、容器内の濃度差が大きいことが示唆された。その後、更に遠心粉碎機を用いて再粉碎したところ、いずれの農薬においても良好な均一性が得られた。小型粉碎器は、単に粉碎するのみで、フィルターを通さないため、粒子径にばらつきを生じる可能性がある。一方、再粉碎に用いた遠心粉碎機は、1.0 mmのフィルターを用いた遠心型の粉碎機であり、粒子径がある程度均一となる。本作製法では、農薬成分は主に米粒表面に吸着していると考えられ、胚乳部までは浸透していない可能性が高い。そのため、より粒子径を小さくかつ均一にする必要があることが示唆された。

同様に、精米についても農薬添加溶媒に浸漬後、浸漬溶媒を留去し、得られた精米を乾燥・粉碎する方法で、粉末試料を作製し、均一性試験を行ったところ、小型遠心器による粉碎では、均一性が得られなかった。そこで、ロックングミキサーによる混合を行わず、遠心粉碎機による再粉碎を行ったところ、概ね良好な均一性が得られた。精米の作製は、浸漬溶液を減圧乾固する際、微細な粒子が内容物の突沸を招き、細心の注意が必要であったことから、実試料作製の上では、玄米試料の方が、減圧乾固の工程が扱いやすいと考えられた。

また、浸漬溶液を減圧乾固後、内容物を取り出した後の粉体フラスコ内壁面の残渣について、各農薬濃度を測定した結果、10個の粉体フラスコ間でばらつきはあったが、いずれの農薬も添加量の約5~7%が微細の粒子とともに粉体フラスコ内壁

面に残留していた。今後、添加量を示す際、数値の取扱いを検討する必要がある。

以上のことから、農薬検査用調査試料として、固体試料である穀類の粉末試料は、遠心粉碎機を用いることで均一化が可能であり、これらの適用は大いに可能性があるが、上記の検討をする際、混合及び均一性試験を順次行ったため、約2か月の期間を要した。その間で、均一性を確保することはできたが、一方で、回収率が玄米及び精米とも経時的に、いずれの農薬も減少する傾向が見られた。これは、玄米及び精米成分が影響している可能性があり、試料中酵素の不活化など、今後は粉末試料中における安定性確保の検討が必要である。

また、固体試料とは別に、これまでの野菜ペーストに加えて新たに枝豆を基材とした調査試料の作製を検討した。

従来の野菜ペーストと同様に、基材に農薬混合標準液を添加し混合(試料中添加濃度:ダイアジノン 0.01 $\mu\text{g/g}$ 、クロルピリホス 0.3 $\mu\text{g/g}$ 、及びマラチオン及びフェニトロチオン 0.5 $\mu\text{g/g}$)したところ、いずれの農薬も均一性が得られなかった。そこで、基材に水分あるいは油分を添加し均質なペースト基材を作製後、農薬混合標準液を添加する方法を検討した。

その結果、水分添加においては、0%、5%、10%及び20%の含量で作製したところ、0%ではF値がクロルピホスの1.889を除き、いずれの農薬も約3.4から5.1と大きい値を示したが、5%~20%の水を添加することで、F値は、いずれの農薬も有意水準5%点より小さくなり、均一性が得られた。回収率や相対標準偏差などを考慮すると、水分添加濃度は10%が適切で

あると考えられた。

油分添加においては、0%、2%、5%及び10%の含量で作製したところ、0%では上述のとおりF値がクロルピホスを除き、いずれの農薬も有意水準5%点より大きい値を示したが、2%~10%の油分(大豆油)を添加することで、F値は、いずれの農薬も有意水準5%点より小さくなり、均一性が得られた。回収率や相対標準偏差などを考慮すると、油分添加濃度は2%~10%が適切であると考えられた。なお、水分あるいは油分をそれぞれの濃度に応じて添加したブランク試料について、得られたクロマトグラムでは、いずれの添加農薬の測定に影響を及ぼすものはなかった。

水分あるいは油分の添加が枝豆ペーストに農薬を均一に混合する際有効であることが示唆され、今後、これらの冷凍保存安定性及び凍結融解安定性を検討する必要がある。

5.2 微生物学検査のための適性調査試料の作製：

試験菌のフィルターへの吸着に関する検討を行った結果、一般細菌数検査の測定において、これまで当方において使用していたストマフィルターNEO(GSIクレオス)ではフィルターなしのストマッカー袋を使用して同様に試験したものと比較して低い回収率を認めたことがなかったが、一部のメーカーでは約40%と低い回収率となった。メーカーによりストマッカー袋に付属のフィルターの孔径や材質も異なっている。このことから、通常当財団において使用しているストマッカー袋と、平成24年度の検討において最も回収率の低かったストマッカ

一袋の2種を用いて、試験菌がフィルターを通過すること、ならびにフィルターへの吸着性の有無を確認するため、寒天状基材の非存在下、試験菌を添加したときのフィルターの内側と外側、すなわち試料溶液の採取側と調査試料をストマッカー袋に入れた側での試験菌濃度の差について確認した。その結果、試験菌の濃度はフィルターの内側と外側ではほぼ同等であり、かつ添加濃度に対する回収率も90~120%を示した。また、回収率は試験菌と寒天状基材を別途加えたときにも同様であった。このことから、試験菌はいずれのストマッカー袋においても通過することが可能であり、フィルターに吸着する可能性も低いものと考えられた。また、この結果を踏まえると、寒天状基材中に封入された試験菌がストマッカー処理により粒子状となった寒天中に取り込まれたままとなり、この寒天粒子がフィルターを通過できなかったことより、回収率が低くなる可能性が示唆された。

これまでの経験から、基材として使用する寒天はメーカーによって硬度等が異なることから、ストマッカー処理後の寒天粒子の残存に大きな影響を及ぼすものと考えられる。そこで、3社(4製品)を用いて、0.6~0.75%の濃度範囲で作製した寒天状基材における回収率について検討した。その結果、低濃度の寒天で作製した基材において、ストマッカー袋間での相違が大きくなった。また、高濃度の寒天で作製した場合には、いずれのストマッカー袋においても回収率が低く、ストマッカー袋間での大きな相違は認められなかった。なお、この傾向は試料の作製42日後においても同様であった。

また、一般細菌数測定用調査試料は陸送

することで各検査機関に配送される。そのため、寒天濃度が低い場合には、輸送時の振動や荷物の取扱いといった衝撃が加わる可能性がある。これにより、基材の破壊ということも考えられることから、作製した寒天状基材を振盪器で容器の縦方向または横方向に振盪したときの、基材の物理的形狀変化について観察した。振盪器に容器を立て、これを振盪したところ、いずれの基材も変形は認められなかった。これに対して、容器を横に設置して振盪を行ったところ、和光純薬の2製品で作製した0.6%の寒天濃度において、容器から基材がはがれた。これ以外の基材では、振盪に伴う基材からの浸出液が増加する傾向はあるものの、基材の崩壊は認められなかった。

寒天粒子をさらに小さくするための手段のひとつとしてストマッカー処理時間の延長が挙げられる。そこで、最も寒天濃度の高い0.75%においてストマッカー処理時間を1分間と3分間で回収率を比較したところ、和光純薬の2製品で作製した基材では3分間のストマッカー処理により試験菌の回収率の上昇が認められたが、これ以外では明らかな回収率の上昇は認められなかった。

さらに、より詳細に検討するため、外部精度管理調査において使用頻度が比較的高く、かつ低めの値を報告した検査機関で採用されていたストマッカー袋を用いて各寒天濃度における回収率を検討したところ、和光純薬の2製品で作製した基材では濃度によらず、ピクソン20(エルメックス)を除く3種のストマッカー袋において高い回収率を示した。これに対して、OXOIDおよびMERCKの寒天で作製した基材では、寒天

の濃度に依存した回収率の低下が認められた。また、いずれの基材においてもピクソン20で回収率が低くなる傾向が認められた。また、寒天およびストマッカー袋の組み合わせにおける試験対象菌の吸着の可能性を検討したところ、通常使用している和光純薬の寒天とサニスペックテストバッグ(サニーフーズ)の組み合わせで回収率が約60%であったものの、これ以外の組み合わせではいずれも回収率が80%以上であったことから、試験対象菌のストマッカー袋への吸着はほとんどないと考えられた。

5.3 アレルギー物質検査のための適正試料の作製検討:

標準品規格では、茨城県産そばおよび中国北方産そばを等量混合した後に粉碎して調製した粉末を使用し、メルカプトエタノールを含む抽出液を用いてタンパク質を抽出するが、操作が複雑であることに加え、試料を各検査機関に送付し、検査者が取り扱う際には毒物であるメルカプトエタノールは含有していないことが望ましい。そこで、あらかじめ粉碎されている市販のそば粉3種類(茨城県産そば粉、中国北方産そば粉およびダッタンそば粉)からそれぞれ2種類の抽出液(メルカプトエタノールを含む(+ME)抽出液またはメルカプトエタノールを含まない(-ME)抽出液)を用いてタンパク質を抽出し、各抽出液のタンパク質濃度を比較した。その結果、すべてのそば粉において-ME抽出液よりも+ME抽出液の方がタンパク質濃度が高かった。しかし、-ME抽出液のタンパク質濃度は標準品規格に記載のタンパク質濃度(2.8~4.2 mg/mL)をいずれも満たすことから、メルカプトエ

タノールを含まない抽出液でもそば粉からのタンパク質抽出は十分可能であることが確認された。

次に、これら 6 種類のそばタンパク質抽出液をそれぞれ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるよう希釈後、3 種類の ELISA キットで測定し、そばタンパク質の定量値を比較した。その結果、茨城県産そば粉および中国北方産そば粉では、すべてのキットでそばタンパク質が検出された。しかし、ダツタンそば粉では、日本ハムキットとモリナガキットでは検出されたが、プリマハムキットでは検出下限以下だった。プリマハムキットはそばタンパク質の検出にモノクローナル抗体を使用していることから、ダツタンそば粉はプリマハムキットのモノクローナル抗体が認識できる抗原タンパク質を含んでいない可能性が考えられた。また、各抽出液を比較した場合、中国北方産（日本ハムキット使用時）を除くすべてのそば粉およびキットにおいて、+ME 抽出液よりも -ME 抽出液で測定値が高かった。また、中国北方産そば粉および -ME 抽出液を使用した溶液でキット間の測定値の差が最も小さかった。

以上の結果より、添加用そばタンパク質溶液の調製には 3 キットの測定値の差が最も少ない中国北方産そば粉および -ME 抽出液を使用することとした。

次に、選定したそば粉および抽出液を用いて調製したそばタンパク質溶液を基材に添加し、回収率および安定性を検討した。すなわち中国北方産そば粉から -ME 抽出液を使用して標準品規格に従って調製したそばタンパク質溶液を、ビスケット、こしあん、カスタードクリーム、チョコレートクリームに添加してそばタンパク質添加試料

を作製した。そばタンパク質の添加量はそれぞれ 8.6 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、9.7 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、8.9 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、8.8 $\mu\text{g}/\text{g}$ とした。各そばタンパク質添加試料のそばタンパク質量を調製直後に 3 種類のキットで測定し、測定値を添加タンパク質量で除して回収率を求めた。その結果、ビスケット、こしあん、カスタードクリーム、チョコレートクリームでそれぞれ日本ハムキットが 175.8%、179.6%、134.5%、108.5%、モリナガキットが 127.5%、120.4%、108.1%、117.6%、プリマハムキットが 108.7%、96.2%、85.5%、86.0% と、日本ハムキット、モリナガキット、プリマハムキットの順に回収率が低くなった。さらに、油分の少ない基材であるビスケット、こしあんは油分の多いカスタードクリーム、チョコレートクリームに比べて回収率が高かった。調製した試料は -20°C で保存し、保存 1 ヶ月後および保存 2 ヶ月後にも保存前と同様に測定し、保存後の測定値を保存前の測定値で除して安定性を求めた。その結果、全ての試料において、モリナガキットでは 97.4~119.1%、プリマハムキットでは 91.2~123.8% と安定性は良好であった。しかし、日本ハムキットでは、保存 1 ヶ月後の安定性が 148.5~164.1%、保存 2 ヶ月後の安定性が 160.3~281.5% と保存期間が長くなるにつれ回収率が高くなる傾向が認められた。平成 19 年度にも、そば粉添加試料において同様の傾向が認められることを報告しており、そばタンパク質の添加方法や添加基材を変更しても改善されないことから、試料ではなくキットに問題がある可能性が考えられた。また、日本ハムキットの検量線作成に使用したそば標準品の実測値を比較したところ、保存前、保

存1ヶ月後、保存2ヶ月後の順に低下していた。一方、試料の実測値は全期間を通してほぼ同程度であった。このことから、日本ハムキットに付属のそば標準品が長期保存により劣化し、検量線の吸光度が低くなるため、試料の定量値が見かけ上高くなる可能性があると考えられた。そこで、保存前の検量線データを使用して、保存1ヶ月後、保存2ヶ月後の試料について再計算して得られた測定値について、安定性を検討した。その結果、全ての試料において、保存1ヶ月後の安定性が77.4~85.7%、保存2ヶ月後の安定性が79.2~89.9%と良好であった。

そば標準品の安定性を検討した結果、日本ハムキットでは試料の保存期間が長くなるにつれ回収率が高くなる傾向が認められた。その原因として、日本ハムキットに同梱されているそば標準品（以下、日本ハム標準品とする）が長期保存により劣化する可能性が考えられた。そこで、そば標準品の安定性について確認するために、日本ハム標準品とモリナガキットに同梱されているそば標準品（以下、モリナガ標準品とする）を日本ハム、モリナガの両キットを使用して測定し、実測値を比較した。なお、キット（同梱のそば標準品を含む）は全て4℃で保存し、測定回数はキット購入時（保存0ヶ月）、保存2ヶ月後の計2回実施した。その結果、モリナガキットで測定した場合、キット購入時の日本ハム標準液とモリナガ標準液の測定値は同程度であり、保存2ヶ月後においても同程度であった。一方、日本ハムキットを用いて測定した場合、キット購入時の日本ハム標準液の測定値は、モリナガ標準液の測定値に比べて低かった。

また、保存2ヶ月後では、日本ハム標準液とモリナガ標準液の両方でキット購入時と比較して測定値が低かった。以上の結果より、標準液中に含まれるそばタンパク質のうち、モリナガキットで検出するタンパク質は長期保存により劣化しないが、日本ハムキットで検出するタンパク質は長期保存により劣化する可能性が考えられた。また、日本ハムキットにおいて、日本ハム標準液がモリナガ標準液に比べて測定値が低かったのは、標準液に記載されている使用期限が日本ハム標準液では2ヶ月短く、モリナガ標準液よりも古いためであると考えられた。また外部精度管理調査を実施するにあたっては、各参加機関で保存期間の異なる標準液を使用して検量線を引いた場合に試料の測定結果に大きく影響する可能性があるため、共通のそば標準品の配布についても検討する必要があると考えられた。

5.4 組換え DNA 技術応用食品検査のための適正試料の作製検討：

遺伝子組換え米の検査に使用する4遺伝子（PLD、CpTI、63Bt、NNBt）について、コメ陽性コントロールプラスミドを水で段階希釈したDNA溶液を鋳型として、9600 emulsion mode および Standard mode の2種類のランモードでそれぞれリアルタイムPCR測定を行い、Ct値を比較した。その結果、PLDおよび63Btでは6濃度中4濃度、NNBtでは6濃度中5濃度で9600 emulsion mode よりも Standard mode でCt値が若干ではあるが大きい傾向にあった。さらに、指数関数的な増幅がみられたウェル数（増幅数）、さらに、指数関数的な増幅が確認されたウェルのうち、48未満のCt値が得ら

れたウェル数（陽性数）について比較した結果、PLD および CpTI の 5 コピー/ウェルでは 9600 emulation mode の増幅数が 6 ウェル中 6 ウェルであったのに対し、Standard mode の増幅数が 6 ウェル中 5 ウェルと増幅しないウェルが 1 ウェルあった。また、NNBt では 5 コピー/ウェルと 2.5 コピー/ウェルの両方で 9600 emulation mode の増幅数が 6 ウェル中 5 ウェルであったのに対し、Standard mode の増幅数が 6 ウェル中 4 ウェルに減少した。

次に、実際の遺伝子組換え食品検査に近づけるため、希釈液を水から非遺伝子組換え米 DNA に変えて DNA 溶液を調製した。この DNA 溶液を鋳型として CpTI、63Bt、NNBt の 3 遺伝子について同様にリアルタイム PCR 測定を行い、モード間の比較を行った。その結果、CpTI ではすべての濃度で 9600 Emulation mode よりも Standard mode で Ct 値が大きく、水で希釈した場合に比べて Ct 値のモード間差が大きい傾向があった。また 63Bt、NNBt では 6 濃度中 4 濃度で Standard mode の Ct 値が若干ではあるが大きく、希釈液に水を用いた場合と同様の傾向がみられた。一方、増幅数は CpTI、NNBt ではいずれの濃度においてもモード間の差はみられなかったが、63Bt の 5 コピー/ウェルでは、9600 Emulation mode の増幅数が 6 ウェル中 6 ウェルであったのに対し、Standard mode の増幅数が 6 ウェル中 5 ウェルとモード間で差がみられた。

以上より、通知法の遺伝子組換え米の検出に使用する 4 遺伝子では、Standard mode を用いて測定を行った場合、9600 Emulation mode に比べ得られる Ct 値が大きく、検出下限付近の低い濃度では増幅数

および陽性数が減少する傾向が確認された。しかし、Ct 値のモード間差はほとんどが 1 サイクル以内と非常に小さいことから、ランモードの違いは判定結果にほとんど影響しないと考えられた。また、今回は併行数および反復数が少なく、検出下限付近の濃度におけるランモードの違いによる増幅の有無についての明確な差は確認できなかった。

通知法に記載されている安全性未審査の遺伝子組換え米のリアルタイム PCR 条件は変性時間が 20 秒間であるのに対し、安全性未審査の遺伝子組換えパパイヤでは 15 秒間と短いため、9600 Emulation mode よりも温度変化が速い Standard mode では、変性時間が短いことによる PCR 反応への影響がより大きくなることが予想された。そこで、遺伝子組換えパパイヤの検査に使用する 4 遺伝子 (Chy、CaM、PRSV-YK、PRSV-SC) について、2 種類のモード間における Ct 値、検出数および陽性数について比較した。ただし、陽性数については、指数関数的な増幅が確認されたウェルのうち、43 未満の Ct 値が得られたウェル数を陽性と判定した。その結果、Ct 値は CaM、PRSV-YK の 1.25 コピー/ウェルを除くすべての遺伝子および濃度で 9600 Emulation mode よりも Standard mode の方が若干小さくなった。しかし、CaM では 1.25 コピー/ウェルにおいて 9600 Emulation mode の増幅数が 6 ウェル中 6 ウェルであったのに対し、Standard mode の増幅数が 6 ウェル中 4 ウェルと増幅しないウェルがあった。また、PRSV-YK では同濃度において 9600 Emulation mode および Standard mode の増幅数がいずれも 6 ウェル中 5 ウェルであっ

たが、陽性数は 9600 Emulation mode が 6 ウェル中 4 ウェル、Standard mode が 6 ウェル中 3 ウェルとモード間で差がみられた。

以上より、通知法の遺伝子組換えパパイアの検出に使用する 4 遺伝子では、Standard mode を用いて測定を行った場合、9600 Emulation mode に比べ得られる Ct 値が小さい傾向にあったが、モード間差は遺伝子組換え米の場合よりもさらに小さく、Ct 値に与える影響はほとんどないと考えられた。また、CaM および PRSV-YK では検出下限付近の低い濃度では増幅数および陽性数が Standard mode で減少する傾向が確認されたが、併行数および反復数が少なく、検出下限付近の濃度におけるランモードの違いによる増幅の有無および増幅の遅れについての明確な差は確認できなかった。

異なるランモードが Ct 値および判定結果に与える影響はほとんどないことが確認された。次に、リアルタイム PCR の測定結果から各遺伝子の増幅効率を算出し、比較した。その結果、遺伝子組換え米の検査に使用する 4 遺伝子 (PLD、CpTI、63Bt、NNBt) では希釈液に水を用いた場合、CpTI および NNBt では各ランモードの増幅効率に差はみられなかったが、PLD および 63Bt では 9600 Emulation mode よりも Standard mode で増幅効率が高かった。さらに、希釈液に非遺伝子組換えコメ DNA を用いて測定した 3 遺伝子 (CpTI、63Bt、NNBt) すべてで、9600 Emulation mode よりも Standard mode で増幅効率が高く、水希釈の時よりもモード間差が大きくなった。3 遺伝子全ての増幅効率が Standard mode で上昇したのは、希釈に使用した非遺伝子組換え米 DNA 溶液に含まれる PCR 反応阻害物質と Standard mode

における温度の切り替えにかかる時間が短いことが影響している可能性が考えられた。

遺伝子組換えパパイアの検査に使用する 4 遺伝子 (Chy、CaM、PRSV-YK、PRSV-SC) では、全ての遺伝子で増幅効率のモード間差が非常に小さく、Standard mode で測定しても 9600 Emulation mode と同様の増幅効率が得られることが確認された。

D. 結論

1 尾花分担研究

今回提示した 2-アルキルシクロブタノンの分析法は通知試験法よりも簡便であり、全機関が初めて行う試験でありながら、試料と標準品を受領してから結果を報告するまで約 2.5 ヶ月という短期間で使用できた。昨年度の畜肉に加えて、植物や魚由来の食品についても照射履歴が正しく判定できたことから、汎用性が高く有用であると考えられた。外部精度管理試験は、Xbar-R 管理図では一部管理限界を超える報告値があったが、本来の照射履歴検知は定性が最重要であり、未知試料 3 種の組合せで、全機関が誤回答なく判定できたことから、全体として良好な結果が得られたと考えられる。

2 齊藤分担研究

DON 汚染が危惧される食品として、従来の小麦類に加えて大麦製品であるビールに着目し、フィールドでの迅速な検査を行うための ELISA の実用性について検証した。その結果、市販の ELISA キットを用いることでビール中 DON のスクリーニングとして十分に適用可能であった。本研究を遂行することによって、国産製品はもとより、輸入食品など市場に流通する食品の安全性評

価や、今後の規制値導入の検討に際して重要な情報を提供することに大いに寄与することが期待される。

今後の研究計画としては、国内産および外国産のビールで国内に流通しているものをできるだけ多く入手し、本年度で検討した ELISA および前年度に構築した GC/MS 法等を用いて、ビール中の DON 残留汚染の実態調査を行うと共に、成人男性など摂取量が多いことが予想されるヒトへの曝露評価を試みる予定である。

2 村山分担研究

GC/MS によるクロロピリホス等の定量においては、GC-FPD によるクロロピリホス個別試験法と比べて定量精度、再現性ともに劣っていた。GC/MS においては、絶対検量線法による回収率が 115~201%であったが、マトリックス検量線法による回収率は 78~148%であり、厚生労働省が示している精度管理ガイドライン（平成 9 年 4 月 1 日）、試験法妥当性評価ガイドライン（平成 22 年 12 月 24 日）に規定されている真度 70~120%の範囲から一部はずれていた。一方、試験溶液への標準溶液添加法による回収率は 91~107%あり、より簡便、高精度なマトリックス効果補正方法であることを実証した。

LC/MS によるサイクラミン酸の定量においては、標準溶液添加法により簡便かつ高精度に定量を行うことができた。標準溶液添加法は人手を省ける上に、より正確な結果が得られる点で、マトリックス検量線法より優れていた。

また、MG および LMG への食品添加物の影響調査の結果、MG は二酸化硫黄と反応性が

高く付加体を生成している可能性が高いことがわかった。また、MG は過酸化水素との反応性は低いことがわかった。一方、LMG は二酸化硫黄、過酸化水素ともに若干反応するが、6 時間室内放置後の減衰はともに 5%以内であった。以上の結果から、検体中に含まれる二酸化硫黄を過酸化水素により酸化処理することにより、MG および LMG の添加回収試験を阻害する可能性がある二酸化硫黄の影響を除去できる可能性が示された。

3 鎗田分担研究

IDMS を適用することにより、外部精度管理調査試料中の分析対象農薬 9 種類を真度と併行精度が良く分析することができた。また、平成 25 年度外部精度管理調査（残留農薬検査 I）の調査試料を分析した結果、同法によって真度が高くかつ不確かさが小さい分析値を得られることを確認した。以上の結果から、IDMS は外部精度管理調査試料中の分析対象農薬の精確分析に有効な方法であると考えられた。

5 渡辺分担研究

5.1 理化学検査のための適正調査試料の作製：

精度管理調査における適正な調査試料作製は重要であり、調査対象項目の濃度の同等性及び調査期間中の濃度の安定性の確保が必須となる。そこで、これらの必須項目を満たす調査試料を作製することを目的とし、実分析をふまえた調査試料の作製を検討し、以下の結論を得た。

着色料では、新基材として、果実ペースト、魚肉製品（鮭フレーク）及び魚肉練り

製品（しんじょう、かまぼこ）を用いた定性検査用調査試料の作製を検討した。その結果、固体・半固体試料として、いずれの基材も適用できることが示唆された。高タンパク質食品あるいは高脂質食品を想定した調査試料として、今年度検討した基材はいずれも有効であると考えられた。

保存料では、果実ペーストを基材として、ソルビン酸及び PHBA エステル類の添加試料作製を試みた。その結果、外観及び均一性試験の結果から、保存条件は冷蔵保存が適していると判断した。また、市場での使用実態及び今回の得られた回収率の観点から、ソルビン酸、PHBA イソプロピル、PHBA ブチル、PHBA イソブチルの4種の保存料について調査試料の添加が期待できるため、今後は、実試料化に向けての冷蔵保存での長期保存安定性を検討する必要がある。また、基材として市販のしんじょうへの添加試料を作製したところ、冷蔵保存、冷凍保存のいずれにおいても良好な均一性が得られた。今後は、実試料配布を考え、冷凍保存条件での長期保存安定性や凍結融解安定性について、検討する必要がある。さらに、かまぼこでは、基材として市販の魚のすり身（生）へ添加し、それを加熱して試料を作製した。加熱前は均一性があることは確認できたが、現加熱方法では、加熱後での均一性が得られていない。そのため、今後は加熱時の容器等も含め、再度、加熱条件について検討する必要がある。

一方、新たに、固体試料である穀類の粉末試料を基材として、玄米及び精米の適用の可能性を検討した。その結果、玄米あるいは精米を粉体フラスコ中で農薬添加溶

媒（酢酸エチル溶液）に浸漬後、浸漬溶媒を留去し、得られた米を乾燥・遠心粉碎することで作製する方法により、良好な均一性が得られることが明らかとなったが、安定性は、作製後数か月で、約 10～20%の農薬濃度の減少が予測され、今後は、安定性を確保する方法の検討が必要である。固体試料での長期安定性が確保できれば、今後内部精度管理用試料としての適用も可能と考える。また、野菜ペーストとして枝豆を基材として試料作製を試みた結果、水分あるいは油分を適宜添加し均質な基材とした後、農薬を添加混合することで、良好な均一性が得られた。実試料化に向けて、今後は、さらに冷凍保存安定性及び凍結融解安定性の確認が必要である。

5.2 微生物学検査のための適正調査試料の作製：

平成 24 年度の外部精度管理調査において、一般細菌数測定用基材として採用している寒天状基材でストマッカー袋のメーカーにより試験対象菌の回収率が異なるとの報告があったことから、この原因について明らかにするべく検討を行った。その結果、一部のストマッカー袋において著しく低い回収率が認められ、この要因としてストマッカー処理した後の寒天の粒子径がストマッカー袋のフィルターを通過することができず、寒天粒子中に取り込まれた試験対象菌を回収することができなかったことに基づくと考えられた。これは試験対象菌がフィルターに吸着しなかったこと、ならびにストマッカー処理時間を延長することで回収率の上昇傾向が認められたことによっても支持される。しかも、使用する寒天のメ

ーカーによっても低い回収率となる傾向は異なり、基材を作製するうえで、非常に重要な要因となることが明らかとなった。寒天状基材は外部精度管理調査の一般細菌数測定検査において秤量が可能であり、かつ安定的に試験対象菌を回収することができることから非常に有益な基材であると考えられる。そのため、本検討結果を踏まえて十分な予備検討を必要とすることに加え、使用機材に影響を受けない基材中の成分の改良等についても検討する必要があることが示唆された。

5.3 アレルギー物質検査のための適正試料の作製検討：

より簡便で安全性の高いそば試料の作製を目的として、3種類のそば粉および2種類の抽出液を用いてタンパク質を抽出し、3キットのELISA測定値から最もキット間の差が少ない組み合わせとして、中国北方産そば粉およびメルカプトエタノールを含まない抽出液を選定した。さらに、そばタンパク質抽出液を基材に添加し、添加回収率および保存安定性について検討した。その結果、すべての試料において、モリナガキット、プリマハムキットで測定した場合は、回収率および安定性ともに良好であった。日本ハムキットで測定した場合には、保存期間が長くなるにつれ、そば標準品の劣化が原因と考えられる検量線の測定値の低下がみられたため、保存前の検量線を使用して保存後の試料の安定性を確認した。その結果、日本ハムキットにおいてもすべての試料で良好な回収率および安定性結果が確認された。

5.4 組換え DNA 技術応用食品検査のための適正試料の作製検討：

通知法に記載されている9600 Emulation mode および通常のリアルタイムPCR機器で設定されているStandard modeを使用し、遺伝子組換え米および遺伝子組換えパパイヤの各遺伝子についてリアルタイムPCRを行い、Ct値、増幅数、陽性数について比較した。その結果、遺伝子組換え米の4遺伝子(PLD、63Bt、NNBt、CpTI)は、Standard modeで測定した場合、9600 Emulation modeよりもCt値が高くなる傾向にあった。一方、遺伝子組換えパパイヤの4遺伝子(Chy、CaM、PRSV-YK、PRSV-SC)は、Standard modeで測定した場合、9600 Emulation modeよりもCt値が低くなる傾向にあったが、モード間のCt値の差は比較的小さく、判定結果にはほとんど影響しないことが明らかになった。また、各遺伝子の増幅効率についても比較した結果、希釈液に水を使用した場合はほとんどの遺伝子でモード間の差は認められなかった。一方、希釈液にDNA溶液を使用した場合にはStandard modeの増幅効率が高く、モード間差が大きくなることから、実際に食品から抽出したDNA溶液中にPCR阻害物質を多く含んでいる場合には、使用するランモードにより、増幅効率に差が生じる可能性が考えられた。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 笠間菊子、小熊恭代、穂山浩、鈴木達也、渡辺卓穂、小島幸一：ダイズおよびトウモロ

コシ抽出 DNA の精製度の検討, 日本食品化学学会誌、20(3), 203-208 (2013)

2. 学会発表

1) 渡辺卓穂、高坂典子、鈴木達也、小島幸一:食品衛生外部精度管理調査のための残留動物用医薬品調査試料の作製検討について:日本食品化学学会第19回総会・学術大会、名古屋、2013.

G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

検査機関の信頼性確保に関する研究

平成 25 年度 分担研究報告書

加工食品中の残留農薬分析及び放射線照射検知の

精度管理体制の構築に関する研究

分担研究者 尾花 裕孝